



11046 U.S. PTO  
09/919854  
08/02/01

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:**

101 09 685.2

**Anmeldetag:**

28. Februar 2001

**Anmelder/Inhaber:**

Degussa AG, Düsseldorf/DE

**Bezeichnung:**

Neue für das sahH-Gen kodierende  
Nukleotidsequenzen

**Priorität:**

09.09.2000 DE 100 44 706.6

**IPC:**

C 12 N, C 12 Q, C 07 H

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 05. Juli 2001  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Nietiedt

## Neue für das sahH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das sahH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren unter Verwendung von Bakterien, in denen das sahH-Gen  
5 verstärkt wird.

### Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie,  
10 in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung, Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum, hergestellt werden. Wegen der  
15 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die  
20 Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

25 Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und  
30 Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von

L-Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

## 5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

### Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt sind L-Lysin und L-Methionin.

- Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. 20 Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

Werden im folgenden L-Methionin oder Methionin erwähnt, sind damit auch die Salze wie z.B. Methionin-Hydrochlorid oder Methionin-Sulfat gemeint.

- Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid 25 aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das sahH-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das 30 die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- 5 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),
- 10 wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der Adenosylhomocysteinase aufweist.

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

- 15 (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder
- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- 20 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

Weitere Gegenstände sind

- 25 ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt;

ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2  
dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend das erfindungsgemäße Polynukleotid,  
5 insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, und  
coryneforme Bakterien, die den Vektor enthalten oder in  
denen das sahH-Gen verstärkt ist.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im  
wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die  
10 erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung  
einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums,  
die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit  
einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen  
Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon  
15 enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung  
enthalten, sind als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA  
und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise  
Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die  
20 für die Adenosylhomocysteinase kodieren, oder um solche  
Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu  
isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der  
des sahH-Gens aufweisen.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung  
25 enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren  
Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen  
hergestellt werden kann, die für die Adenosylhomocysteinase  
kodieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide,  
30 enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz  
besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende  
Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit  
einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

Gegebenenfalls sind auch Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 100, 150, 200, 250 oder 300 Nukleotiden geeignet.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld  
5 herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

10 Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem  
15 Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

20 Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Adenosylhomocysteinase und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind  
25 mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die  
30

insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das sahH-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum (C. glutamicum), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032  
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806  
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870  
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539  
Corynebacterium melassecola ATCC17965  
Brevibacterium flavum ATCC14067  
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und  
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme.

Das neue, für das Enzym Adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1.) kodierende sahH-Gen von *C. glutamicum* wurde isoliert.

Zur Isolierung des sahH-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: *Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie* (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (*Cell* 50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (*Molecular and General Genetics*, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, *Nucleic Acids Research* 16:1563-1575) angelegt wurde.

Börmann et al. (*Molecular Microbiology* 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHc79 (Hohn und Collins, *Gene* 11, 291-298 (1980)).

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, *Life Sciences*, 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, *Gene*, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli* Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 $\alpha$ mc<sup>r</sup>, der von Grant et al. (*Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend wiederum in



gängige, für die Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Die neue für das Gen sahH kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des sahH-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ („sense mutations“) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences

3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology  
6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der  
Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die  
sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind  
5 ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1  
oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der  
Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der  
Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)  
10 unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich  
aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben  
typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels  
Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im  
15 Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter  
Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH  
(Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.  
(International Journal of Systematic Bacteriology (1991)  
41: 255-260). Die Hybridisierung findet unter stringenten  
20 Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride  
gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit  
der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70%  
identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der  
Hybridisierung einschließlich der Waschschrte durch  
25 Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der  
Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die  
Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ  
niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschrten  
durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited,  
30 Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x  
SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C  
eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit  
Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70%

- Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und
- 5 gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x
- 10 SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der
- 15 eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).
- 20 Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer
- 25 Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Überexpression des sahH-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

- 30 Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des

Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Aminosäure-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Malumbres et al. (Gene 134, 15 - 24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60:512-538 (1996)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Zur Verstärkung wurde das erfindungsgemäße sahH-Gen beispielhaft mit Hilfe von episomalen Plasmiden überexprimiert. Als Plasmide eignen sich solche, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren wie z.B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554),

pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107:69-74 (1991)), beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren wie z.B. solche, die auf pCG4

- 5 (US-A 4,489,160), oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

- Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe  
 10 derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur  
 15 Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise  
 20 pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-A 5,487,993), pCR®Blunt (Firma  
 25 Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den  
 30 gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind  
 35 beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS

Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross over"-Ereignisses enthält der resultierende Stamm mindestens zwei Kopien des betreffenden Gens.

- 5 Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, neben dem sahH-Gen eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls
- 10 regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

So kann für die Herstellung von L-Aminosäuren zusätzlich zur Verstärkung des sahH-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 15 • das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 20 • das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende
- 25 Gen zwf (JP-A-09224661),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mqo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry
- 30 254, 395-403 (1998)),

- das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512),
  - das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222),
  - 5 • das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A 0131171),
  - das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr) (Möckel et al., 10 (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),
  - das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen ilvBN (EP-B 0356739),
  - das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD 15 (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1973-1979),
  - das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwal (DE: 19959328.0, DSM 13115),
- verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.
- 20 Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Verstärkung des sahH-Gens eines oder mehrere Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1; DSM 13047),
  - 25 • das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478; DSM 12969),

- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE: 1995 1975.7; DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113)

5 abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Überexpression des *sahH*-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms", in: 10 Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren 15 (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel 20 (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den 25 Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

30 Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren



wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- 5 Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und  
10 Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- Als Schwefelquelle, insbesondere für die Herstellung von Methionin, können organische und anorganische schwefelhaltige Verbindungen wie beispielsweise Sulfide,  
15 Sulfite, Sulfate und Thiosulfate verwendet werden.

- Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie  
20 z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die  
25 genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

- Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw.  
30 Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem

Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur  
5 eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden  
10 erreicht.

Die so erhaltenen, insbesondere L-Methionin enthaltenden Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-% und enthalten L-Methionin. Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation  
15 zumindest am Ende, insbesondere jedoch über mindestens 30% der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gefahren wird. Das heißt, dass während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf  $\geq 0$  bis 3 g/l gehalten, beziehungsweise abgesenkt wird.

20 Die in dieser Weise hergestellte, insbesondere L-Methionin haltige, Fermentationsbrühe wird anschließend weiterverarbeitet. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden wie z.B. der Zentrifugation, der Filtration, dem Dekantieren oder einer  
25 Kombination hieraus aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden. Anschließend wird diese mit bekannten Methoden wie z.B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, oder durch  
30 Nanofiltration eingedickt beziehungsweise konzentriert. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann anschließend durch Methoden der Gefriertrocknung, der Sprühtrocknung, der Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren zu einem vorzugsweise rieselfähigen, feinteiligen Pulver  
35 aufgearbeitet werden.

Dieses rieselfähige, feinteilige Pulver kann dann wiederum durch geeignete Kompaktier- oder Granulier-Verfahren in ein grobkörniges, gut rieselfähiges, lagerbares und weitgehend staubfreies Produkt überführt werden. Vorteilhaft bei der Granulation oder Kompaktierung ist der Einsatz von üblichen organischen oder anorganischen Hilfsstoffen, beziehungsweise Trägern wie Stärke, Gelatine, Cellulosederivaten oder ähnlichen Stoffen, wie sie üblicherweise in der Lebensmittel- oder Futtermittelverarbeitung als Binde-, Gelier-, oder Verdickungsmittel Verwendung finden, oder von weiteren Stoffen wie zum Beispiel Kieselsäuren, Silikaten oder Stearaten.

Unter „rieselfähig“ versteht man Pulver, die aus einer Serie von Glasauslaufgefäßen mit verschiedenen großen Auslauföffnungen mindestens aus dem Gefäß mit der Öffnung 5 mm (Millimeter) ungehindert auslaufen (Klein, Seifen, Öle, Fette, Wachse 94, 12 (1968)).

Wie hier beschrieben, ist mit „feinteilig“, ein Pulver mit überwiegendem Anteil ( $> 50\%$ ) einer Korngröße von 20 bis 200  $\mu\text{m}$  Durchmesser gemeint. Mit „grobkörnig“ sind Produkte mit überwiegendem Anteil ( $> 50\%$ ) einer Korngröße von 200 bis 2000  $\mu\text{m}$  Durchmesser gemeint. In diesem Sinne, bedeutet „staubfrei“, daß das Produkt lediglich geringe Anteile ( $< 5\%$ ) an Körngrößen unter 20  $\mu\text{m}$  Durchmesser enthält. Die Korngrößenbestimmung kann mit Methoden der Laserbeugungsspektrometrie durchgeführt werden. Die entsprechenden Methoden sind im Lehrbuch zur „Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis“ von R. H. Müller und R. Schuhmann, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1996) oder im Lehrbuch „Introduction to Particle Technology“ von M. Rhodes, Verlag Wiley & Sons (1998) beschrieben.

„Lagerbar“, im Sinne dieser Erfindung, bedeutet ein Produkt, das bis zu 120 Tagen, bevorzugt bis 52 Wochen,

besonders bevorzugt 60 Monate gelagert werden kann ohne das ein wesentlicher Verlust (< 5%) an Methionin auftritt.

Alternativ kann das Produkt aber auch auf einen in der Futtermittelverarbeitung bekannten und üblichen organischen  
 5 oder anorganischen Trägerstoff wie zum Beispiel Kieselsäuren, Silikate, Schrote, Kleien, Mehle, Stärken Zucker oder andere aufgezogen und/oder mit üblichen Verdickungs- oder Bindemitteln vermischt und stabilisiert werden. Anwendungsbeispiele und Verfahren hierzu sind in  
 10 der Literatur (Die Mühle + Mischfuttertechnik 132 (1995) 49, Seite 817) beschrieben.

Schließlich kann das Produkt durch Beschichtungsverfahren („Coating“) mit Filmbildnern wie beispielsweise  
 Metallcarbonate, Kieselsäuren, Silikate, Alginat,  
 15 Stearate, Stärken, Gummis und Celluloseether, wie in der DE-C-4100920 beschrieben, in einen Zustand gebracht werden, in dem es stabil gegenüber der Verdauung durch Tiermägen insbesondere dem Magen von Wiederkäuern ist.

Wird die Biomasse während des Verfahrens abgetrennt, werden  
 20 im allgemeinen weitere, zum Beispiel während der Fermentation zugesetzte anorganische Feststoffe entfernt. Daneben enthält das erfindungsgemäße Tierfuttermitteladditiv zumindest den überwiegenden Teil der in der Fermentationsbrühe gelöst vorliegenden, weiteren  
 25 gebildeten oder zugesetzten, insbesondere organische Stoffe, soweit sie nicht durch geeignete Verfahren abgetrennt wurden.

In einem Aspekt der Erfindung kann die Biomasse bis zu 70%, bevorzugt bis zu 80%, bevorzugt bis zu 90%, bevorzugt bis  
 30 zu 95%, und besonders bevorzugt bis zu 100% abgetrennt werden. In einem weiteren Aspekt der Erfindung werden bis zu 20% der Biomasse, bevorzugt bis zu 15%, bevorzugt bis zu 10%, bevorzugt bis zu 5%, besonders bevorzugt keine Biomasse abgetrennt.

Zu diesen organischen Stoffen gehören organische Nebenprodukte, die von den bei der Fermentation eingesetzten Mikroorganismen gegebenenfalls neben dem L-Methionin erzeugt und gegebenenfalls ausgeschieden werden.

- 5 Dazu zählen L-Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Lysin, L-Valin, L-Threonin, L-Alanin oder L-Tryptophan. Dazu zählen Vitamine ausgewählt aus der Gruppe Vitamin B1 (Thiamin), Vitamin B2 (Riboflavin), Vitamin B5 (Pantothersäure), Vitamin B6 (Pyridoxin), Vitamin B12 (Cyanocobalamin), Nicotinsäure/Nicotinsäureamid und Vitamin
- 10 E (Tocopherol). Dazu gehören weiterhin organische Säuren, die ein bis drei Carboxyl-Gruppen tragen wie zum Beispiel Essigsäure, Milchsäure, Zitronensäure, Apfelsäure oder Fumarsäure. Schließlich gehören dazu auch Zucker wie zum
- 15 Beispiel Trehalose. Diese Verbindungen sind gegebenenfalls erwünscht, wenn sie die nutritive Wertigkeit des Produktes verbessern.

- Diese organischen Stoffe einschließlich des L-Methionins und/oder D-Methionins und/oder des racemischen Gemisches
- 20 D,L-Methionin können auch je nach Anforderung während eines geeigneten Verfahrensschrittes als Konzentrat oder Reinsubstanz in fester oder flüssiger Form hinzugefügt werden. Diese genannten organischen Stoffe können einzeln oder als Mischungen zur erhaltenen oder aufkonzentrierten
- 25 Fermentationsbrühe, oder auch während des Trocknungs- oder Granulationsprozesses hinzugefügt werden. Es ist gleichfalls möglich einen organischen Stoff oder eine Mischung mehrerer organischen Stoffe zur Fermentationsbrühe und einen weiteren organischen Stoff oder eine weitere
- 30 Mischung mehrerer organische Stoffe bei einem späteren Verfahrensschritt, beispielsweise der Granulation, hinzuzufügen.

Das oben beschriebene Produkt ist als Futtermittelzusatz, d.h. Futtermittel-Additiv, für die Tierernährung geeignet.

Der L-Methionin-Gehalt des Tierfuttermittel-Additivs beträgt üblicherweise 1 Gew.-% bis 80 Gew.-%, bevorzugt 2 Gew.-% bis 80 Gew.-%, besonders bevorzugt 4 Gew.-% bis 80 Gew.-%, und ganz besonders bevorzugt 8 Gew.-% bis 80 Gew.-%, bezogen auf die Trockenmasse des Tierfuttermittel-Additivs. Gehalte von 1 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 2 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 4 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 6 Gew.-% bis 60 Gew.-%, 1 Gew.-% bis 40 Gew.-%, 2 Gew.-% bis 40 Gew.-% oder 4 Gew.-% bis 40 Gew.-% sind gleichfalls möglich. Der Wassergehalt des Futtermittel-Additivs beträgt üblicherweise bis zu 5 Gew.-%, bevorzugt bis zu 4 Gew.-%, und besonders bevorzugt weniger als 2 Gew.-%.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist dementsprechend ein Verfahren zur Herstellung eines L-Methionin haltigen Tierfuttermittel-Additivs aus Fermentationsbrühen, gekennzeichnet durch die Schritte

- a) Kultivierung und Fermentation eines L-Methionin produzierenden Mikroorganismus in einem Fermentationsmedium;
- 20 b) Entfernung von Wasser aus der L-Methionin haltigen Fermentationsbrühe (Aufkonzentration);
- c) Entfernung der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 Gew.-%; und
- 25 d) Trocknung der gemäß a) und/oder b) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.

Wenn erwünscht, können in dem erfindungsgemäßen Verfahren weiterhin eine oder mehrere der folgenden Schritte durchgeführt werden:

- 30 e) Zusatz von einem oder mehreren der organischen Stoffe, einschließlich L-Methionin und/oder D-Methionin

und/oder des racemischen Gemisches D,L-Methionin, zu dem gemäß a), b) und/oder c) erhaltenen Produkten;

- f) Zugabe von Hilfstoffen zu den nach a) bis d) erhaltenen Stoffen zur Stabilisierung und Erhöhung der Lagerfähigkeit ausgewählt aus der Gruppe Kieselsäuren, Silikate, Stearate, Schrot und Kleie; oder
- g) Überführung der nach a) bis e) erhaltenen Stoffe in eine Tiermagen insbesondere Pansen stabile Form durch Beschichtung („Coating“) mit Filmbildnern.

- 10 Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Ionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie
- 15 kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

- 20 Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al.

- 25 (Molecular Cloning. A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von Escherichia coli sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

- Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.
- 30

Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus  
*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032  
 5 wurde wie bei Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179)  
 beschrieben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI  
 (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
 Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell  
 gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer  
 10 Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland,  
 Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)  
 dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1  
 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of  
 Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma  
 15 Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1  
 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem  
 Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg,  
 Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02)  
 gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase  
 20 dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym  
 BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
 Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.  
 Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der  
 25 behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-  
 DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland,  
 Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-0870-04)  
 behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit  
 Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La  
 30 Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing  
 Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des *E. coli* Stammes NM554 (Raleigh et al.  
 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575) wurden die Zellen  
 in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der



- Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar
- 5 (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 100 mg/l Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

### Beispiel 2

#### Isolierung und Sequenzierung des sahH-Gens

- 10 Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-
- 15 0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im
- 20 Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

- Die DNA des Sequenziervektors pZero-1, bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande,
- 25 Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01), wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den
- 30 Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde

anschließend in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 mg/l Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet.

Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurde mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1497 Basenpaaren, welches als sahH-Gen bezeichnet wurde. Das sahH-Gen kodiert für ein Protein von 498 Aminosäuren.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa AG

5 &lt;120&gt; Neue für das sahH-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; 000493 BT

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

15

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1939

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

20

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (227)..(1720)

&lt;223&gt; sahH-Gen

25

&lt;400&gt; 1

tcgcggccat catgtttggc gtcctatatt ctgcgggccca ggtgctggag aattacccat 60

ttatccgoga actcgtcggg gagggctctg aagctcttcg cgggtgctgca gcgcagggttt 120

30

tggaagaggc agatgtggaa tatgacctcg aagcttattt agaggccctc aactagccct 180

ccactaaaca gcttcaatca attcgggtgtc cactccaaca tgtaga gtg gtg cgc 235

Met Val Arg

35

1

gtt aaa aaa gtt ttc cta att ttc att ttc tta aaa gga gct cgc cag 283

Val Lys Lys Val Phe Leu Ile Phe Ile Phe Leu Lys Gly Ala Arg Gln

5

10

15

40

gac atg gca cag gtt atg gac ttc aag gtt gcc gat ctt tca cta gca 331

Asp Met Ala Gln Val Met Asp Phe Lys Val Ala Asp Leu Ser Leu Ala

20

25

30

35

45

gag gca gga cgt cac cag att cgt ctt gca gag tat gag atg cca ggt 379

Glu Ala Gly Arg His Gln Ile Arg Leu Ala Glu Tyr Glu Met Pro Gly

40

45

50

50

ctc atg cag ttg cgc aag gaa ttc gca gac gag cag cct ttg aag ggc 427

Leu Met Gln Leu Arg Lys Glu Phe Ala Asp Glu Gln Pro Leu Lys Gly

55

60

65

55

gcc cga att gct ggt tct atc cac atg acg gtc cag acc gcc gtg ctt 475

Ala Arg Ile Ala Gly Ser Ile His Met Thr Val Gln Thr Ala Val Leu

70

75

80

att gag acc ctc act gct ttg ggc gct gag gtt cgt tgg gct tcc tgc 523

Ile Glu Thr Leu Thr Ala Leu Gly Ala Glu Val Arg Trp Ala Ser Cys

85

90

95

	aac att ttc tcc acc cag gat gag gct gca gcg gct atc gtt gtc ggc	571
	Asn Ile Phe Ser Thr Gln Asp Glu Ala Ala Ala Ile Val Val Gly	
	100 105 110 115	
5	tcc ggc acc gtc gaa gag cca gct ggt gtt cca gta ttc gcg tgg aag	619
	Ser Gly Thr Val Glu Glu Pro Ala Gly Val Pro Val Phe Ala Trp Lys	
	120 125 130	
10	ggt gag tca ctg gag gag tac tgg tgg tgc atc aac cag atc ttc agc	667
	Gly Glu Ser Leu Glu Glu Tyr Trp Trp Cys Ile Asn Gln Ile Phe Ser	
	135 140 145	
15	tgg ggc gat gag ctg cca aac atg atc ctc gac gac ggc ggt gac gcc	715
	Trp Gly Asp Glu Leu Pro Asn Met Ile Leu Asp Asp Gly Gly Asp Ala	
	150 155 160	
20	acc atg gct gtt att cgc ggt cgc gaa tac gag cag gct ggt ctg gtt	763
	Thr Met Ala Val Ile Arg Gly Arg Glu Tyr Glu Gln Ala Gly Leu Val	
	165 170 175	
25	cca cca gca gag gcc aac gat tcc gat gag tac atc gca ttc ttg ggc	811
	Pro Pro Ala Glu Ala Asn Asp Ser Asp Glu Tyr Ile Ala Phe Leu Gly	
	180 185 190 195	
30	atg ctg cgt gag gtt ctt gct gca gag cct ggc aag tgg ggc aag atc	859
	Met Leu Arg Glu Val Leu Ala Ala Glu Pro Gly Lys Trp Gly Lys Ile	
	200 205 210	
35	gct gag gcc gtt aag ggt gtc acc gag gaa acc acc acc ggt gtg cac	907
	Ala Glu Ala Val Lys Gly Val Thr Glu Glu Thr Thr Thr Gly Val His	
	215 220 225	
40	cgc ctg tac cac ttc gct gaa gaa ggc gtg ctg cct ttc cca gcg atg	955
	Arg Leu Tyr His Phe Ala Glu Glu Gly Val Leu Pro Phe Pro Ala Met	
	230 235 240	
45	aac gtc aac gac gct gtc acc aag tcc aag ttt gat aac aag tac ggc	1003
	Asn Val Asn Asp Ala Val Thr Lys Ser Lys Phe Asp Asn Lys Tyr Gly	
	245 250 255	
50	acc cgc cac tcc ctg atc gac ggc atc aac cgc gcc act gac atg ctc	1051
	Thr Arg His Ser Leu Ile Asp Gly Ile Asn Arg Ala Thr Asp Met Leu	
	260 265 270 275	
55	atg ggc ggc aag aac gtg ctt gtc tgc ggt tac ggc gat gtc ggc aag	1099
	Met Gly Gly Lys Asn Val Leu Val Cys Gly Tyr Gly Asp Val Gly Lys	
	280 285 290	
60	ggc tgc gct gag gct ttc gac ggc cag ggc gct cgc gtc aag gtc acc	1147
	Gly Cys Ala Glu Ala Phe Asp Gly Gln Gly Ala Arg Val Lys Val Thr	
	295 300 305	
65	gaa gct gac cca atc aac gct ctt cag gct ctg atg gat ggc tac tct	1195
	Glu Ala Asp Pro Ile Asn Ala Leu Gln Ala Leu Met Asp Gly Tyr Ser	
	310 315 320	
70	gtg gtc acc gtt gat gag gcc atc gag gac gcc gac atc gtg atc acc	1243
	Val Val Thr Val Asp Glu Ala Ile Glu Asp Ala Asp Ile Val Ile Thr	
	325 330 335	

15

	Ala	Arg	Gln	Asp	Met	Ala	Gln	Val	Met	Asp	Phe	Lys	Val	Ala	Asp	Leu	
				20					25					30			
5	Ser	Leu	Ala	Glu	Ala	Gly	Arg	His	Gln	Ile	Arg	Leu	Ala	Glu	Tyr	Glu	
			35					40					45				
	Met	Pro	Gly	Leu	Met	Gln	Leu	Arg	Lys	Glu	Phe	Ala	Asp	Glu	Gln	Pro	
		50					55					60					
10	Leu	Lys	Gly	Ala	Arg	Ile	Ala	Gly	Ser	Ile	His	Met	Thr	Val	Gln	Thr	
	65					70					75					80	
	Ala	Val	Leu	Ile	Glu	Thr	Leu	Thr	Ala	Leu	Gly	Ala	Glu	Val	Arg	Trp	
15					85					90					95		
	Ala	Ser	Cys	Asn	Ile	Phe	Ser	Thr	Gln	Asp	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Ile	
				100					105					110			
20	Val	Val	Gly	Ser	Gly	Thr	Val	Glu	Glu	Pro	Ala	Gly	Val	Pro	Val	Phe	
			115					120					125				
	Ala	Trp	Lys	Gly	Glu	Ser	Leu	Glu	Glu	Tyr	Trp	Trp	Cys	Ile	Asn	Gln	
		130					135					140					
25	Ile	Phe	Ser	Trp	Gly	Asp	Glu	Leu	Pro	Asn	Met	Ile	Leu	Asp	Asp	Gly	
	145					150					155					160	
	Gly	Asp	Ala	Thr	Met	Ala	Val	Ile	Arg	Gly	Arg	Glu	Tyr	Glu	Gln	Ala	
30					165					170					175		
	Gly	Leu	Val	Pro	Pro	Ala	Glu	Ala	Asn	Asp	Ser	Asp	Glu	Tyr	Ile	Ala	
				180					185					190			
35	Phe	Leu	Gly	Met	Leu	Arg	Glu	Val	Leu	Ala	Ala	Glu	Pro	Gly	Lys	Trp	
		195						200					205				
	Gly	Lys	Ile	Ala	Glu	Ala	Val	Lys	Gly	Val	Thr	Glu	Glu	Thr	Thr	Thr	
		210					215					220					
40	Gly	Val	His	Arg	Leu	Tyr	His	Phe	Ala	Glu	Glu	Gly	Val	Leu	Pro	Phe	
	225					230					235					240	
	Pro	Ala	Met	Asn	Val	Asn	Asp	Ala	Val	Thr	Lys	Ser	Lys	Phe	Asp	Asn	
45					245					250					255		
	Lys	Tyr	Gly	Thr	Arg	His	Ser	Leu	Ile	Asp	Gly	Ile	Asn	Arg	Ala	Thr	
				260					265					270			
50	Asp	Met	Leu	Met	Gly	Gly	Lys	Asn	Val	Leu	Val	Cys	Gly	Tyr	Gly	Asp	
		275						280					285				
	Val	Gly	Lys	Gly	Cys	Ala	Glu	Ala	Phe	Asp	Gly	Gln	Gly	Ala	Arg	Val	
		290					295					300					
55	Lys	Val	Thr	Glu	Ala	Asp	Pro	Ile	Asn	Ala	Leu	Gln	Ala	Leu	Met	Asp	
	305					310					315					320	
	Gly	Tyr	Ser	Val	Val	Thr	Val	Asp	Glu	Ala	Ile	Glu	Asp	Ala	Asp	Ile	
					325					330					335		

Val Ile Thr Ala Thr Gly Asn Lys Asp Ile Ile Ser Phe Glu Gln Met  
 340 345 350  
 5 Leu Lys Met Lys Asp His Ala Leu Leu Gly Asn Ile Gly His Phe Asp  
 355 360 365  
 Asn Glu Ile Asp Met His Ser Leu Leu His Arg Asp Asp Val Thr Arg  
 370 375 380  
 10 Thr Thr Ile Lys Pro Gln Val Asp Glu Phe Thr Phe Ser Thr Gly Arg  
 385 390 395 400  
 Ser Ile Ile Val Leu Ser Glu Gly Arg Leu Leu Asn Leu Gly Asn Ala  
 405 410 415  
 15 Thr Gly His Pro Ser Phe Val Met Ser Asn Ser Phe Ala Asp Gln Thr  
 420 425 430  
 20 Ile Ala Gln Ile Glu Leu Phe Gln Asn Glu Gly Gln Tyr Glu Asn Glu  
 435 440 445  
 Val Tyr Arg Leu Pro Lys Val Leu Asp Glu Lys Val Ala Arg Ile His  
 450 455 460  
 25 Val Glu Ala Leu Gly Gly Gln Leu Thr Glu Leu Thr Lys Glu Gln Ala  
 465 470 475 480  
 Glu Tyr Ile Gly Val Asp Val Ala Gly Pro Phe Lys Pro Glu His Tyr  
 485 490 495  
 30 Arg Tyr  
 35

## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das sahH-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
  - 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
  - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
  - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
  - 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c)

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der Adenosylhomocysteinase aufweist.
- 20 2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
- 25 4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
  - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder



- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz  
(i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des  
genetischen Kodes entspricht, oder
  - (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur  
Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz  
hybridisiert, und gegebenenfalls
  - (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung  
unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC  
durchgeführt wird.
  7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein  
Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2  
dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
  8. Coryneforme Bakterien, in denen das sahH-Gen  
verstärkt, insbesondere überexprimiert wird.
  9. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-  
Aminosäuren, insbesondere L-Lysin und L-Methionin,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man  
folgende Schritte durchführt:
    - a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure  
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen  
man zumindest das sahH-Gen oder dafür kodierende  
Nukleotidsequenzen verstärkt, insbesondere  
überexprimiert;
    - b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in  
den Zellen der Bakterien, und
    - c) Isolieren der L-Aminosäure.
  10. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien

einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

- 5 11. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
- 10 12. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzt, und der Plasmidvektor die für das sahH-Gen kodierende Nukleotidsequenz trägt.
- 15 13. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das sahH-Gen kodiert (kodieren) verstärkt, insbesondere überexprimiert.
- 20 14. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die katalytischen Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) erhöht, für das das Polynukleotid sahH kodiert.
- 25 15. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

  - 15.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA,
  - 30 15.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap,

- 15.3 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi,
- 15.4 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk,
- 5 15.5 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen zwf,
- 15.6 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc,
- 10 15.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mgo,
- 15.8 das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 15.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 15 15.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom,
- 15.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA oder das für eine feed back resistente Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr),
- 20 15.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierende Gen ilvBN,
- 15.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD,
- 25 15.14 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1

verstärkt bzw. überexprimiert.

- 16. Verfahren gemäß Anspruch 9, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung

von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 5      16.1    das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase  
              kodierende Gen pck,
- 16.2    das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase  
              kodierende Gen pgi,
- 16.3    das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB
- 16.4    das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2
- 10      abschwächt.

17. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der ein Polynukleotid gemäß Anspruch 1 trägt.

15      18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen der Art Corynebacterium glutamicum einsetzt.

19. Verfahren zur Herstellung eines L-Methionin haltigen Tierfuttermittel-Additivs aus Fermentationsbrühen, gekennzeichnet durch die Schritte

- 20      a)    Kultivierung und Fermentation eines L-Methionin produzierenden Mikroorganismus in einem Fermentationsmedium;
- b)    Entfernung von Wasser aus der L-Methionin haltigen Fermentationsbrühe (Aufkonzentration);
- 25      c)    Entfernung der während der Fermentation gebildeten Biomasse in einer Menge von 0 bis 100 Gew.-%; und
- d)    Trocknung der gemäß b) und/oder c) erhaltenen Fermentationsbrühe, um das Tierfuttermittel-

Additiv in der gewünschten Pulver- oder Granulatform zu erhalten.

20. Verfahren gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet  
5 dass daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man  
zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges von L-  
Methionin verstärkt.
21. Verfahren gemäß Anspruch 20, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man Mikroorganismen  
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest  
10 teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung L-  
Methionin verringern.
22. Verfahren gemäß Anspruch 20, d a d u r c h  
g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression  
der Polynukleotide, die für das sahH-Gen kodieren  
15 verstärkt, insbesondere überexprimiert.
23. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden  
Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e  
t, daß man Mikroorganismen der Art Corynebacterium  
glutamicum einsetzt.
- 20 24. Verfahren gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet  
dass man zusätzlich noch einen oder mehrere folgender  
Schritte durchführt:
  - e) Zusatz von einem oder mehreren der organischen  
25 Stoffe, einschließlich L-Methionin und/oder D-  
Methionin und/oder des racemischen Gemisches D,L-  
Methionin, zu dem gemäß b), c) und/oder d)  
erhaltenen Produkten;
  - f) Zugabe von Hilfstoffen zu den nach b) bis e)  
30 erhaltenen Stoffen zur Stabilisierung und  
Erhöhung der Lagerfähigkeit ausgewählt aus der  
Gruppe Kieselsäuren, Silikate, Stearate, Schrot  
und Kleie; oder

g) Überführung der nach b) bis f) erhaltenen Stoffe in eine Tiermagen insbesondere Pansen stabile Form durch Beschichtung („Coating“) mit Filmbildnern.

- 5 25. Verfahren gemäß Anspruch 19 oder 24, dadurch gekennzeichnet dass ein Teil der Biomasse entfernt wird.
26. Verfahren gemäß Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet dass bis zu 100% der Biomasse entfernt wird.
- 10 27. Verfahren gemäß Anspruch 19 oder 24, dadurch gekennzeichnet dass der Wassergehalt bei bis zu 5 Gew.-% liegt.
28. Verfahren gemäß Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet dass der Wassergehalt bei weniger als 2 Gew.-% liegt.
- 15 29. Verfahren gemäß Anspruch 24, 25, 26, 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet dass die Filmbildner Metallcarbonate, Kieselsäuren, Silikate, Alginat, Stearate, Stärken, Gummis oder Celluloseether sind.
- 20 30. Tierfuttermittel-Additiv hergestellt gemäß Ansprüchen 19 bis 29.
31. Tierfuttelmittel-Additiv gemäß Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, dass es 1 Gew.-% bis 80 Gew.-% L-Methionin, D-Methionin, D,L-Methionin oder einer Mischung davon, bezogen auf die Trockenmasse des Tierfuttermittel-Additivs, enthält.
- 25 32. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für die Adenosylhomocysteinase kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des sahH-Gens aufweisen, d a d u r c h
- 30 g e k e n n z e i c h n e t, daß man das

Polynukleotid, enthaltend die Polynukleotidsequenzen  
gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4, als  
Hybridisierungssonden einsetzt.

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid, enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70%  
10 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das sahH-Gen verstärkt vorliegt, und die  
20 Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.